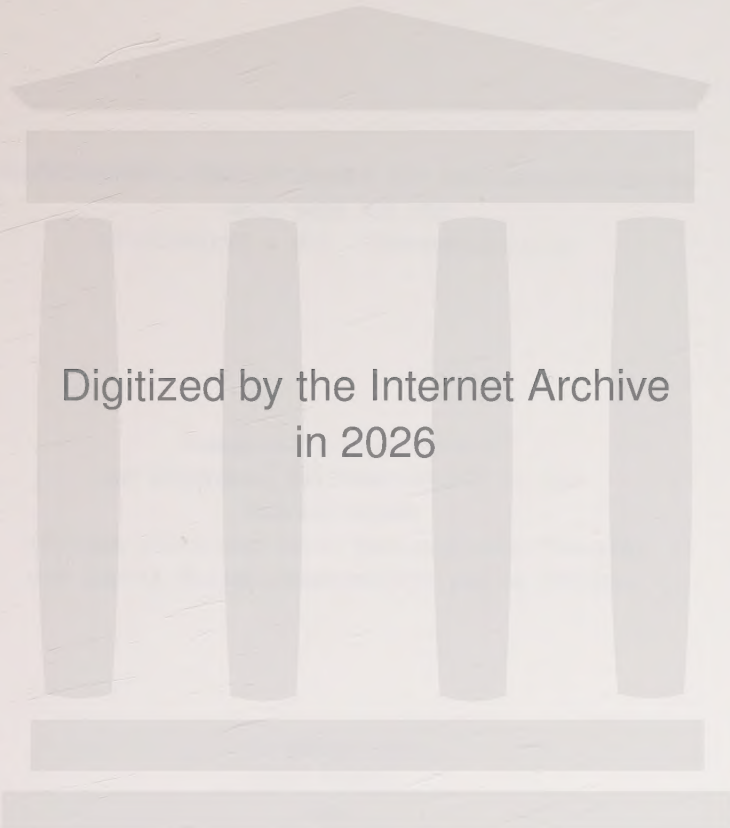


**MOLEKULARGEWICHTSSCHÄTZUNGEN VON
HERZMUSKELPROTEINEN BEIM KALB MIT DER
DÜNN SCHICHT-GEL-CHROMATOGRAPHIE**

Axel Nobis

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0094

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. N. Zöllner

MOLEKULARGEWICHTSSCHÄTZUNGEN VON HERZMUSKELPROTEINEN
BEIM KALB MIT DER
DÜNNSCICHT - GEL - CHROMATOGRAPHIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Axel Nobis
aus
Dinklage
1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Nowy
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1974

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS:

EINLEITUNG:

METHODIK:

I Gewinnung des Myokardextraktes

1. Herkunft des Materials
2. Aufbereitung der Organe
3. Extraktion
4. Ultrafiltration
5. Elektrophorese
6. Einengung der Fraktionen

II Dünnschicht-Gel-Chromatographie

1. Aufbereitung des Gels
2. Beschreibung des Arbeitsgerätes
 - a) Trennkammer
 - b) Chromatographiergerät
3. Auftragen des Gels
4. Auftragen der Proteine
5. Starten des Versuches
6. Abbrechen des Versuches
7. Papierabklatsch
8. Anfärben der Proteine
9. Auswertung
10. Eichung des Ablaufgerätes

ERGEBNISSE:

I Einteilung der Fraktionen

II Beschreibung eines Ablaufes nach dem Färben

III Molekulargewichtsschätzungen

DISKUSSION:

I Diskussion der Methodik

II Diskussion der Ergebnisse

ZUSAMMENFASSUNG:

LITERATURVERZEICHNIS:

EINLEITUNG

Schon 1895 führte F ü r t h (28) Untersuchungen von Muskeleiweiß bei Muskelpressaft durch und stellte fest, daß das Sarkoplasma nur Proteine mit Albumineigenschaften enthielt. Er gibt ihnen den Namen Myogen. W e b e r und M e y e r (66) fanden eine Fraktion Globulin X, die bei der Dialyse der Sarkoplasmaproteine ausfiel. 1939 konnte B a r a n o w s k y (8) Myogen A kristallisieren. Durch die Entwicklung der Elektrophorese konnte T i s e l l u s (62) 1930 Eiweiß analysieren. 1947 gelang es J a c o b (38) und 1950 D u b u i s s o n (25) mit Hilfe der Elektrophorese bis zu 8 Proteine aus Skelettmuskelextrakt nachzuweisen.

Aufklärung über die Funktion des Kontraktilen Apparates, aber auch der intrazellulären Stoffwechselmechanismen brachten die zahlreichen Forschungen der letzten Jahre, die sich meistens mit dem Aufbau des Skelettmuskels, aber auch der Herzmuskulatur beschäftigen. Vergleichende Elektrophoresen von Herz- und Skelettmuskelproteinen, die von N o w y und Mitarbeitern (53) erstellt wurden, zeigen zwischen beiden Muskeltypen große Differenzen. Ferner befaßte sich N o w y (51, 53) mit der Proteinzusammensetzung des Myocards und fand 7 bis 10 Fraktionen, deren Komponenten nicht nur Spezies-verschiedene Merkmale zeigten, sondern er fand auch quantitative Unterschiede innerhalb eines Organs zwischen Atrium und Ventrikel.

Die Erforschung der Herzmuskelproteine hat sich in den letzten Jahren mehr und mehr den Enzymen gewidmet. Über das Gesamtmuster der Proteine des Herzens, die qualitative Verteilung, sowie über Molekulargewichte ist wenig bekannt.

Der Gebrauch der Dünnschicht-Gel-Chromatographie zur Untersuchung der Proteine ist in vielen Veröffentlichungen beschrieben worden (3, 5, 11, 16, 18, 19, 21-23, 32, 34, 40,

41, 45, 46, 48-50, 57, 58, 61, 63, 64). Für eine Zahl von Proteinen ist eine Beziehung gefunden worden zwischen ihrem Ablauf, bezogen auf ein Standardprotein, und dem Molekulargewicht (5, 11, 21-23, 48, 58). Trotz der Einfachheit und Gebrauchsfähigkeit für die Bestimmung von Molekulargewichten hat die Methode bis jetzt noch keine große Anwendung gefunden, besonders wenn man sie vergleicht mit der Gel-Filtration in der Säulentechnik und anderen Methoden in der Dünnschicht-Chromatographie.

Unsere Aufgabe ist es, aufbauend auf die Ergebnisse und Erfahrungen von Nowy eine Bestimmung der Molekulargewichte der Herzmuskelproteine beim Kalb mit der Dünnschicht-Gel-Chromatographie durchzuführen.

METHODIK

I Gewinnung des Myocardextraktes

1. Herkunft des Materials

Um einen geeigneten Herzmuskelextrakt zu bekommen, verwendeten wir gesunde Tiere. Nur so war eine allgemein gültige Aussage über Herzmuskelproteine zu machen. Die Herzen durften also keinerlei pathologische Veränderungen zeigen, wie postmortale Autolyse und bakterielle Zersetzung, ferner eine bestimmte Altersgrenze nicht überschritten haben, um Organatrophien auszuschließen. Es war darauf zu achten, daß die Tiere weder auf Grund von Krankheiten oder sonstigen Schäden notgeschlachtet wurden.

Zu diesen Herzen von gesunden Kälbern gelangten wir durch den städtischen Schlachthof in München. Da wir bei der Schlachtung selbst dabei waren, lag nur eine minimale Zeit zwischen Schlachtung, Organentfernung und Aufbereitung.

2. Aufbereitung der Organe

Die Technik der Aufbereitung geht auf N o w y zurück, der sie bereits mit Erfolg zur Herstellung von Kalbsherzextrakten anwendete.

Nach der Organentfernung am Schlachthof wurde das noch schlagende Herz an Ort und Stelle mit physiologischer Kochsalzlösung gründlich gesäubert.

Darauf folgte eine Spülung der Koronargefäße unter einem Druck von 150 cm Wassersäule mit derselben Lösung so lange, bis auf der venösen Seite klare Flüssigkeit herauslief. Bis zur weiteren Verarbeitung im Labor kam das Herz in Trockeneis.

Hier wurde auf eisgekühlter Unterlage weitergearbeitet, um eine Erwärmung des Materials zu vermeiden.

Nach der Entfernung von Bindegewebe, Fett und Gefäßstamm, trennten wir Atrium und Ventrikel in der Ventilebene voneinander, wogen die Teile und zerkleinerten sie. Dann wurde das Myocard mit der doppelten Gewichtsmenge aqua bidestillata im Eisbad bei 0° C homogenisiert (Homogenisator E. Bühler, Tübingen 7000 U/min).

3. Extraktion

Um einen Auszug zu gewinnen wurde das Homogenat 18 Stunden im Kühlschrank bei 2° C gerührt und im Anschluß mit 30 000 U/min bei 0° C über 2 1/2 Stunden ultrazentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge L2, Rotor 30, mittlere Beschleunigung: 78500 g).

Der Extrakt, ein klarer, rotbrauner Überstand wurde weiterverarbeitet, das Sediment verworfen.

Durch die Biuretmethode wurde ein Gesamteiweißgehalt von ca. 1 g/100 ml festgestellt.

4. Ultrafiltration

Wir tauchten die Ultrafilter (6390-1, LKB-Produkte AB, Stockholm, Ausschlußgrenze bei Mol.-Gew. 30 000) mit den Filterkörben in den eiswassergekühlten Extrakt. Die Dialyse wurde durch ein Vakuum beschleunigt, das durch eine Wasserstrahlpumpe entstand. Dadurch erhöhte sich die Eiweißkonzentration und der Gehalt an niedermolekularen Substanzen wurde vermindert. Das Konzentrat ergab innerhalb von 10 Stunden einen Eiweißgehalt von 3-4 g/100 ml. An der Tönung des Dialysates war zu erkennen, daß ein geringer Teil des

Myoglobins die Membranschranke durchdrungen hat. Das Proteinkonzentrat wurde aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung eingefroren; die Ultrafiltrate zur anderen Verwendung gefriergetrocknet.

5. Elektrophorese

N o w y (52) erreichte durch eine kontinuierliche trägerfreie Elektrophorese eine gro~~b~~e Trennung und Anreicherung der Proteinkomponenten des Kalbsherzens. Hierbei stellte sich eine größere Menge uneinheitlicher Fraktionen dar, die dann mittels mehrmaliger präparativer Papierelektrophorese gereinigt wurden. Die auf diese Weise gewonnenen 9 - 10 Fraktionen wurden anschließend von uns weiterverwendet.

6. Einengung der Fraktionen

Die durch diese Aufbereitungsart verdünnten Fraktionen mußten wieder auf einen Eiweißgehalt von 0,5 g - 2 g auf 100 ml gebracht werden. Diese Konzentration führten wir in zwei Stufen durch, mit Carbowax (Polyäthylenglycol Typ 40 000, Serva Heidelberg) in Dialysierschläuchen (Union Carbide Corporation, Chicago).

Innerhalb weniger Stunden wurden die Fraktionen mittels eines größeren dünnwandigen Dialysierschlauches auf ca. 1 ml und dann in spitzen Zentrifugengläsern mit kleinen Dialysierschläuchen auf ca. 100 Mikroliter gebracht. Die Einengung erfolgte im Kühlschrank, wo die Fraktionen auch bis zur weiteren Verwendung für die Dünnschicht-Gel-Chromatographie gelagert wurden.

II Dünnschicht - Gel - Chromatographie

Sind nur geringe Probenmengen vorhanden, dann kann zur Molekulargewichtsbestimmung noch die Dünnschicht-Gel-Chromatographie eingesetzt werden (Determann, H., 19).

Sie wurde bisher zur Trennung von Proteinen herangezogen (Johansson, B.G. und Rymo, L., 40, 41, Agostoni, A., Vergani, C. und Cirila, E., 2), auch in zwei Dimensionen, und ließ sich mit Elektrophorese (Hanson, L.A., Johansson, B.G. und Rymo, L., 31, 32) oder Immunodiffusion kombinieren (Cannegie, P.R. und Pacheo, G., 14; Grant, G.H. und Everall, J., 30) und zur Molekulargewichtsbestimmung (Determann, H. und Michel, W., 21; Morris, C.J.O.R., 48) von Proteinen verwenden.

Es ist eine Chromatographie auf Schichten gequollener Molekularsiebe und wird heute noch relativ wenig angewandt. Sie diente uns zur weiteren Trennung der elektrophoretischen Fraktionen. Als Gel gebrauchen wir **S e p h a d e x** ein stark **h y d r o p h i l e s** Gel, ein modifiziertes **Poly-saccharid** in Perlform, das nach seinem Quellungsgrad im Wasser typisiert wird. Es eignet sich besonders dazu Substanzen nach ihrer Molekülgröße zu trennen.

Im Gegensatz zu den üblicherweise angewandten Dünnschichtmaterialien besitzen die gequollenen Gele kein Ansaugvermögen für Elutionsmittel, so daß absteigend bei einem Neigungswinkel zwischen 15° und 30° chromatographiert werden muß, wobei das Elutionsmittel die Gelschicht von oben nach unten durchläuft.

Das System besteht also aus einer stationären Phase, dargestellt durch die geneigte Platte, und einer mobilen Phase, dem Elutionsmittel, das die Platte hinunterläuft.

Bestandteile einer auf die Gelplatte gebrachten Probe drin-

gen abhängig von der Molekülgröße und -form in das Gel ein. Hier werden sie verschieden stark retiniert und laufen so unter langsamer Trennung die Platte hinunter.

Moleküle, die kleiner als der Fraktionierungsbereich sind, bleiben fast auf gleicher Höhe der Auftragsstelle, während Moleküle mit größerem Durchmesser als dem der Hohlräume der Raumnetzstruktur des Gels, nicht in das Gel eindringen und dadurch am schnellsten wandern.

Um ein Austrocknen der Gelschicht während der Chromatographie zu vermeiden, muß die Trennung in einer geschlossenen Kammer durchgeführt werden.

Eine Verwandtschaft dieser Methode mit der Säulenchromatographie zeigt sich in der Ähnlichkeit der entsprechenden Eichkurven. (Andrews, P., 5; Carnegie, P.R. und Pacheco, G., 14)

Die Dünnschicht - Gel - Chromatographie läßt sich auch dort mit Vorteil anwenden, wo die Säulengelchromatographie nur noch beschränkt angewendet werden kann. Manche Trennprobleme, z.B. geringe Unterschiede des wirksamen Molekülradius können nur durch Verwendung sehr langer Säulen gelöst werden. Die Säulendimensionen lassen sich aber nicht beliebig vergrößern, sehr lange Säulen zeigen bei Deformation der Gelpartikel keinen Durchfluß mehr. Bei Chromatographie auf dünnen Schichten kann auch bei sehr langen Trennwegen ohne Deformation der Gelpartikel und ohne Unterbrechung des Durchflusses chromatographiert werden. (Jaworek, D., 39)

1. Aufbereitung des Gels

Als Gel verwenden wir Sephadex G - 200 superfine (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Schweden). Es hat einen Perlen-durchmesser von 10 - 40 μ , ein Aufnahmevermögen an Wasser

von 20,0 ml/g ($\pm$ 2,0 ml/g). Das Gelvolumen umgerechnet auf das trockene Sephadex liegt bei 30 - 40 ml/g. Der Fraktionierungsbereich umfaßt Peptide und globuläre Proteine mit Molekulargewichten zwischen 5 000 - 800 000.

Bevor es zur Gelchromatographie verwendet werden kann, ist auf richtige Aufbereitung zu achten. Es werden 10 g Substanz in 1000 ml aqua dest aufgeschwemmt und 2-3 Tage langsam bei Raumtemperatur unter Rühren quellen gelassen oder 5-6 Stunden unter gelegentlichem Umrühren im Wasserbad zum Sieden gebracht. Danach soll sich das Gel absetzen. Etwa eine Stunde später dekantiert man das destillierte Wasser ab. Nun wurde das Gel mit Tris - EDTA - Borsäure-Puffer 3 - 4 Mal durchgespült.

Zusammensetzung des Puffers (pH 8,9)

Tris	605,0 g
EDTA	60,0 g
Borsäure	46,0 g
+ aqua dest ad 10,0 l	

(Verdünnung 1 + 2,5 Teile aqua dest)

Das fertige Gel wird in Gläser gefüllt, wobei der Überschuß an Pufferlösung beibehalten wird, und dann ca. eine Woche im Kühlschrank vor der Weiterverarbeitung aufbewahrt wird. Wenn das aufbereitete Sephadex länger gelagert werden soll, empfiehlt es sich, es mit etwa 0,02 % NaN_2 (Natriumacid) gegen mikrobielles Wachstum zu schützen.

Ehe das Gel später auf die Platten aufgetragen wird, sollte man es evakuieren um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden, die zu einem ungleichmäßigen Durchfluß führen.

2. Beschreibung des Arbeitsgerätes

a) Trennkammer

Johansson, Rymo und Morris (41,48) brachten die Gelplatte zur Chromatographie in eine feuchte Kammer. Durch das große Innenvolumen kam es aber zu erheblichen Nachteilen, da ein Teil des Ablaufmittels auf der Platte verdampft und es dadurch zu Konzentrations- und Komponentenveränderungen in der Gelschicht kommen kann.

Von Determann und Michel (21) stammt die Idee, diese große Kammer durch eine dünne Sandwichkammer auszuwechseln, wie sie für die aufsteigende Dünnschichtchromatographie im Gebrauch ist. Durch links und rechts aufgelegte Kartonstreifen werden die Platten auf Abstand gehalten und anschließend durch Klammern fixiert. Um das System möglichst gut abzudichten, mußten die Klammer sehr fest sitzen. Hierbei konnte es beim Zusammenpressen zur Verschiebung der Kartonstreifen kommen und die Gelschicht konnte verletzt werden. Durch dieses einfache Prinzip kam es zu kürzeren Ablaufzeiten, da aus der Gelschicht kein Elutionsmittel verdampfen konnte.

Diese Kammer war aber noch nicht optimal, denn die Kartonstreifen schlossen das Lumen nicht gut ab, so daß es nicht zu einem idealen Kammersystem kam. Ferner machte sich der Randeffect dadurch bemerkbar, daß sich diese Kartonstreifen mit Elutionsmittel vollsaugen und dadurch die Proteine seitlich abwanderten.

Unsere Arbeitsmethode bestand jetzt darin, daß wir Silikonschläuche nahmen, sie längs schlitzten und auf die Kanten der Deckplatte aufzogen. Dadurch daß wir verschiedene Schlauchdicken verwendeten, ließ sich der Abstand der Plat-

ten ändern. Außerdem ersparen wir uns bei dieser Methode die Klammern mit ihren vorher beschriebenen Nachteilen, ebenso können wir die Platten bis zu einem Winkel von 75° gegen die Horizontale neigen, ohne daß sie sonst anderweitig gehalten werden müßten.

Auch nehmen die Schläuche keine Flüssigkeit auf, was uns den Randeffect sehr gering hält.

Die Kammer ist dadurch so dicht, daß kaum Feuchtigkeit verdampfen kann und die Abläufe somit sehr gleichmäßig, da das Elutionsmittel gleichmäßig herabläuft.

c. Chromatographiegerät

Unser Chromatographiegerät der Firma Boehringer Mannheim, war eine bewegliche schiefe Ebene. An den Seitenwänden links und rechts waren Auflageflächen für die Trennkammer. Oben und unten hing jeweils ein Elutionsmitteltrog. Die Auflageflächen ließen sich mit Hilfe einer Randelschraube in ihrem Winkel zur Horizontalen ändern. Ferner konnte man den Seitenabstand der Wände verschieden einstellen.

Da unsere Ablaufplatten ein Format von 20 X 20 cm besaßen, stellten wir den Seitenabstand auf 20,5 cm fest. Ferner ergab sich durch unsere Vorversuche, daß ein Ablaufwinkel von 30° für uns am günstigsten war, den wir auch während der Versuche nicht änderten.

3. Auftragen des Gels

Das vorbereitete Gel wird durch vorsichtiges A b d e - k a n t i e r e n der dünnen Suspension oder durch Filtrieren auf die richtige Konsistenz gebracht. Mit einem Spatel wird eine Probe entnommen und dünn auf eine Glasplatte aufgetragen. Läuft das Gel nun von der schräg gehaltenen Platte herunter, dann muß länger filtriert bzw. abdekantiert werden. Wenn die Gelschicht beim Auftragen unterbrochen wird, so ist sie zu fest und es muß noch Elutionsmittel bzw. dünner Gelbrei dazugegeben werden.

Ferner ist darauf zu achten, daß die Glasplatten gründlich gesäubert werden. Wir wuschen sie mit einer Haemosol-Lösung in der angegebenen Verdünnung, wobei besonders darauf zu achten ist, daß auch die Ränder sauber und fettfrei sind. Danach wurden sie unter laufendem Leitungswasser und zum Abschluß mit reichlich aqua dest gespült. Hernach trockneten wir die Platten mit Zellstoff ab, wobei keine Flusen auf der Fläche bleiben durften.

Auf die saubere Platte wurde ein Gelstreichgerät (Boehringer Mannheim) gesetzt, das speziell für das Auftragen gequollener Molekularsiebe entwickelt wurde. Die Kammer für das Gel ist von oben her zugänglich, dadurch kann es gleichmäßig über den austretenden Schlitz verteilt werden und wenn nötig neues hinzugefügt werden.

Nach dem Füllen wird das Gerät über die Glasplatte gezogen, wobei sich ein dünner Film bildet, der eine Schichtdicke von 0,5 mm besitzt. Ist der Brei an einigen Stellen nicht gleichmäßig, so kann er durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen verbessert werden. Die fertige Gelschicht darf keine Querstreifen mehr aufweisen.

Nach dem Bestreichen wird die Platte etwa 5 min bei Raumtemperatur horizontal gelagert. Die Gelplatten sollen nicht

im Voraus beschichtet werden und in einer feuchten Kammer aufbewahrt werden, da sie dabei vom Rand her austrocknen und es so zu Fehlern kommt.

4. Auftragen der Proteine

Die mit Gel beschichtete Glasplatte wird in das Hilfsgerät eingeschoben, das von uns konstruiert wurde (Abb. 2). Dabei liegt die Glasplatte auf einer Grundplatte mit vorderer und seitlicher Begrenzung. Eingeschoben in die Grundplatte über dem Gel ist die Doppelbrücke mit den Führungsrinnen für die Mikropipette. Die Gelplatte stößt vorne an die Grundplatte und seitlich an einen Pfeiler der Doppelbrücke.

Jetzt wird die Mikropipette in die Führungsrinne gelegt und mit dem Finger gegen ein Herausrutschen gesichert. Die Proteine werden aufgetragen in einem Abstand von 3 cm vom vorderen Rand der Gelplatte und einer Entfernung von 1 - 2 cm untereinander.

Die Spitze der Nadel sollte dabei nicht das Gel verletzen. Es werden etwa 1 - 3 μ l aufpipettiert, die einen Durchmesser von 4 - 5 mm ergeben sollten. Dabei wird eine möglichst hohe Konzentration von 20 - 50 μ g auf 2 - 5 μ l gewählt.

Zum Ausgleich einer möglichen uneinheitlichen Gelschicht wird entweder jeder Proteinprobe vor dem Auftragen zu 50 % Myoglobin zugesetzt, oder Myoglobin und das Testprotein eins um andere Mal auf der Gelplatte aufgetragen, das besonders dann, wenn das Testprotein Bestandteile enthält, die sehr nahe am Molekulargewicht des Myoglobins liegen und sich später schlecht auf dem Abklatsch voneinander abgrenzen lassen.

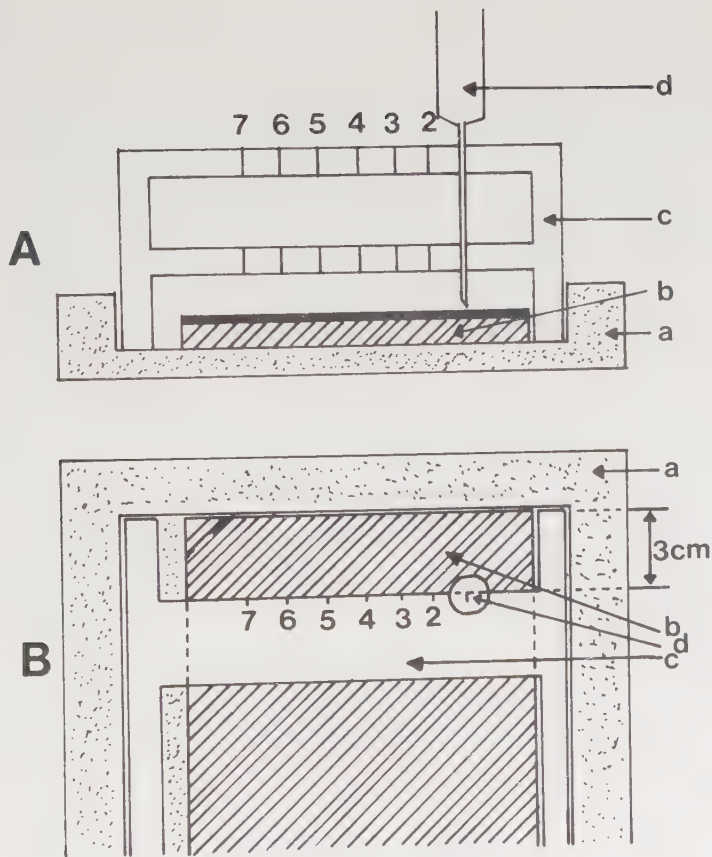


Abb. 2

Hilfsgerät zum Auftragen der Proteine

A Querschnitt

B Aufsicht von oben

- a) Grundplatte mit seitlicher und vorderer Begrenzung
- b) beschichtete Gelplatte
- c) Doppelbrücke mit Führungsrinnen (1 - 7)
- d) Mikropipette in Führungsrinne 1

5. Starten des Versuches

Das Ablaufgerät muß auf einer waagerechten Ebene stehen, um ein seitliches Abfließen der Proteine zu verhindern. Danach ist mit einer Wasserwaage auszumessen, ob die Kammerträger auf die gleiche Höhe eingestellt sind und damit den gleichen Winkel besitzen. Nach dem Füllen der Elutionsmittelbehälter wird die Gelplatte in das Gerät auf die Kammerträger gelegt. Filterpapierstreifen (Macherey und Nagel 212) die auf die Größe 5 X 19,5 cm zugeschnitten wurden, werden in der Breite im Verhältnis 2 zu 3 gefaltet und in ein Bad mit Tris - EDTA - Borsäure - Puffer gelegt. Wenn die Streifen voller Puffer sind, nimmt man sie heraus, läßt sie abtropfen und streift sie in Fließpapier leicht aus. Die 2 cm breite Seite kommt jetzt auf die Glasplatte, die 3 cm breite Seite hängt im Elutionstrog (am Anfang und Ende der Platte je einen Streifen). Beim Auflegen auf die Gelschicht ist darauf zu achten, daß diese nicht verletzt wird oder sich ein Streifen löst. Man geht am besten dabei so vor, daß der Knick des Streifens am Glasrand liegt, und nun das Papier von der Mitte aus vorsichtig auf die Gelschicht gesenkt wird. Dabei dürfen keine Luftblasen unter dem Streifen entstehen.

Auf die Gelschicht kommt jetzt die Deckplatte, die an den Seiten mit Silikonschläuchen versehen ist und vorne und hinten einen Parafilm aufgeklebt hat der über die Behälter mit Elutionsmittel gelegt wird.

6. Abbrechen des Versuches

Ein Anhaltspunkt zum Abbrechen des Versuches war die Wanderung des Myoglobins um etwa 5 - 6 cm, die Zeit beträgt dafür bei richtig bereiteten Gelplatten mit einem Neigungs-

winkel von 30° etwa 3-4 Stunden. Die Parafilmstreifen werden auf die Deckplatte umgelegt und der untere Filterpapierstreifen herausgezogen, dann kann die obere Platte abgenommen werden und die Gelplatte mit den abgelaufenen Proteinen herausgenommen und in die horizontale Lage gebracht werden.

Anschließend wird der obere Filterpapierstreifen entfernt.

7. Papierabklatsch

Die Gelplatte mit den abgelaufenen Proteinen wird in eine Ecke der Grundplatte des Auftragegerätes (Abb. 2) fest angelegt und nun vorsichtig ein Filterpapier der Größe 20 X 21 cm (Macherey und Nagel 212) auf Stoß auf die Platte gelegt. Es darf dabei keine Luftblase unter dem Papier entstehen. Nun wird die Brücke mit den Führungsrinnen eingesetzt, dann mit Hilfe der Mikropipette die Auftragsstellen aufgesucht und mit einem weichen Bleistift markiert. Nach der Abnahme des Papiers von der Platte wird es in horizontaler Lage mit der Gelschicht nach oben unter einem Fön getrocknet. Erst wenn das Papier vollständig trocken ist, kann es angefärbt werden.

8. Anfärben der Proteine

Der Papierabklatsch wird etwa 10 min in Amidoschwarzlösung geleert und anschließend gut mit Wasser gespült. Danach kommt das Papier in Phosphorentfärber:

200 ml Methanol

100 ml Eisessig

und wird dann erneut gespült. Das Entfarberbad wird etwa 2-3 mal gewechselt und das Papier dann getrocknet.

9. Auswertung

Die Flecken werden mit einem Bleistift umkreist und die Mitte ausgemessen. Häufig hat eine unbekannte Fraktion noch einen Schweif am Anfang oder Ende, der nur am oberen oder unteren Rand eingezeichnet wird. Die Wanderungsstrecke der einzelnen Proteine wird auf Myoglobin bezogen. Diese R_{Myo} -Werte werden gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes der Eichproteine aufgetragen. Die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine lassen sich nach Einzeichnen des R_{Myo} -Wertes direkt ablesen.

10. Eichung des Ablaufgerätes

(Die Eichung wurde gemeinsam mit C. Nobis-Dähnke, Diss. München 1974 erstellt.)

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Myocardproteine des Kalbsherzens wurden die Ablaufgeräte für die Dünnschicht-Gel - Chromatographie von uns unter identischen Bedingungen geeicht. Als Eichproteine verwendeten wir:

	(Molekulargewicht)
Myoglobin	17 800
Chymotrypsinogen A	25 000
Albumin Ei	45 000
Albumin Pferd	67 000
Albumin Mensch	69 000
Aldolase	147 000
γ -Globulin	160 000

Bei der Eichung, die wir über eine versuchsreihe von mehreren Taten durchführten und diese etwa 4 Mal wiederholten kamen wir zu den Ergebnissen der Tabelle 1 und der Eichkurve.

Die Proteine der Eichkurve stammten von:
Serva Entwicklungslabor Heidelberg und
Boehringer, Calibration Kit 15967 KEAB.

Tabelle I

Werte zur Eichkurve

Versuche	B:A	C:A	D:A
1: 5.5.- 8.5.	1,0908	1,3156	---
2: 14.7.-16.7.	1,1109	1,2935	---
3: 20.7.-22.7.	1,1111	1,28	---
4: 28.7.-30.7.	1,114	1,2604	1,4543

Versuche	E:A	F:A	G:A
1: 5.5.- 8.5.	1,5053	1,7887	1,8702
2: 14.7.-16.7.	1,4875	1,751	1,905
3: 20.7.-22.7.	---	1,746	1,857
4: 28.7.-30.7.	1,469	1,740	1,826

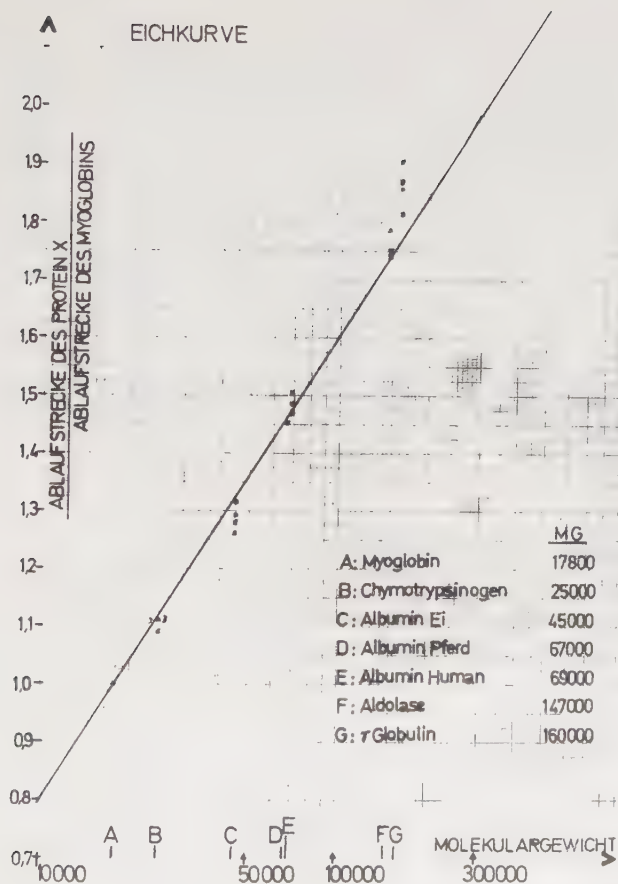
Die einzelnen Werte sind Mittelwerte aus 6-8 Abläufen.

Wert B:A = Chymotrypsinogen : Myoglobin

"	C:A = Albumin Ei	:	"
"	D:A = Albumin Pferd	:	"
"	E:A = Albumin Human	:	"
"	F:A = Aldolase	:	"
"	G:A = γ -Globulin	:	"

▲

EICHKURVE



ERGEBNISSE

I Einteilung der Fraktionen

Bei der Elektrophorese des Herzmuskelextraktes erkennt man mehrere Komponenten, die sich zum Teil überlagern, es treten aber 9 besonders hervor. Dubuissou (25) teilt sie in drei Hauptgruppen, andere Autoren ordnen sie zu den Serumproteinen, mit denen aber noch keine physicochemische Identität nachgewiesen ist. Uns schien diese Einteilung unzureichend, und wir hielten uns deshalb an die von Nowy (51) und anderen Autoren verwendete Nomenklatur. Es wurde das am meisten zur Anode wandernde Myoalbumin als Fraktion 1 und das Myoglobin, das schon ungefärbt als rotbrauner Streifen zu sehen ist, als Fraktion 6 bezeichnet. Die so aufgeteilten 9 bis 10 Fraktionen wurden von uns auf ihr Molekulargewicht hin geprüft.

II Beschreibung eines Ablaufes nach dem Färben

In Abb. 3 liegen bei A und X die Auftragstellen für Myoglobin und Testfraktion. Es ist zu erkennen, daß das Myoglobin als kreisförmiger Fleck nach dem Ablauf wieder auftritt. Bei der Testfraktion X ist es schwieriger einzelne Unterteilungen zu erkennen. In diesem Fall gab es drei Flecken B, C, D die rund und oval sind. Ferner gab es einen Schweif von E bis zum Fleck B und von D über die Länge G bis F. Zwischen den Flecken B, C, D ist die Fortführung des Schweifes zu erkennen.

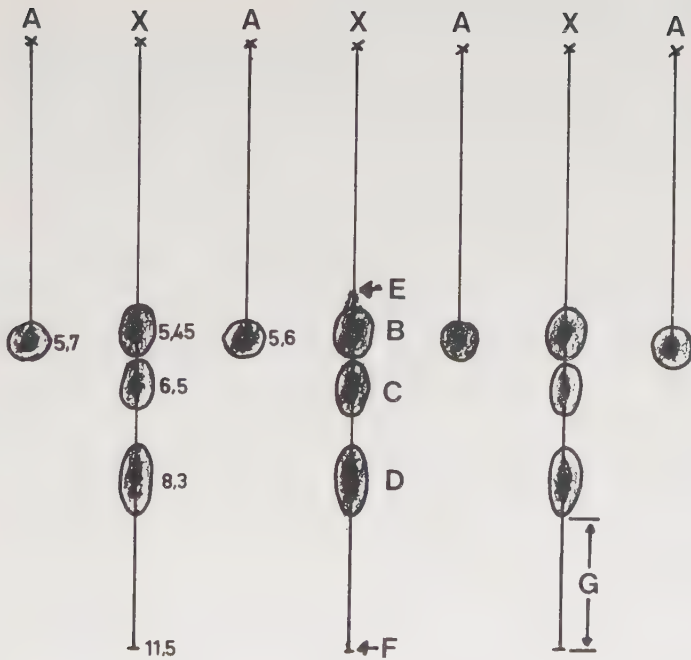


Abb. 3

Ablauf zur Ermittlung der Fraktion "E₅ Kalb"

A = Myoglobin (Auftragestelle)

X = Fraktion E₅ (Auftragestelle)

B, C, D = einheitliche Komponenten

E = Beginn des Schweißes

F = Ende des Schweißes

Die Zahlen geben die Länge des Ablaufes in cm an.

III Molekulargewichtsschätzungen

Bei der großen Fehlerbreite des von uns angewendeten Systems ist eine genauere Molekulargewichtsbestimmung nicht möglich. Die in den folgenden Abschnitten aufgeführten Molekülgrößen haben eine relativ hohe Schwankungsbreite. Die Gründe werden später angeführt.

F r a k t i o n E I: zeigt einen fast dreieckigen Schweif, bei dem sich eine starke Anfärbung in der Spitze befindet, aus der sich ein Molekulargewicht (MG) von 64000 berechnen läßt. Der Schweif endet bei ca. 68000. Es ist also eine Fraktion, die etwa mit dem Serumalbumin übereinstimmt.

F r a k t i o n E II: läßt einen langen Schweif erkennen, dessen Beginn bei einem MG von 13500 liegt und der Ovale aufweist, das erste bei MG 62000 und das zweite über der Ausschlußgrenze (AG) für Sephadex G 200 Superfine von MG 800000.

F r a k t i o n E III: besteht aus einem langen Schweif dessen Beginn bei einem MG von 14000 liegt und über die A.G. hinausläuft. Zwei Hauptflecken sind zu erkennen, der eine bei MG 113000, der andere in der Ausschlußgrenze MG 800 000. Ferner ist bei einigen Abläufen ein schwacher Fleck in der Höhe des MG des Myoglobins zu erkennen.

F r a k t i o n E IV: ist ein Schweif, der mit einer Komponente von MG 17500 beginnt. Die zweite Komponente liegt bei einem MG von 47500, es besteht die Möglichkeit, daß das große Oval aus zwei Komponenten besteht, von einem MG von ca. 37000 und 67000. Das dünne Ende des Schweifes liegt bei 160 000. Auf einigen Abläufen ist ein noch feinerer längerer Schweif sehr schwach zu erkennen, der ein noch höheres MG andeutet.

Einige andere Abläufe mit der Fraktion "E IV (rein)" ergeben ein Bild mit dem MG 17500 und MG 47500 die in Verbindung stehen.

F r a k t i o n E V: ist ein breiter Streifen mit drei Komponenten mit dem MG von 17000, 26000 und 60000, wobei MG 17000 am Anfang und MG 60000 am Ende des Schweißes liegt. MG 26000 ist eine sehr kleine kaum auszumachende Komponente. In einigen Abläufen ist ein dünner weiterlaufender Schweiß zu erkennen bis zu einem MG von ca. 140 000.

F r a k t i o n E V a: besteht aus einem kaum zu erkennen Oval dessen MG bei 86000 liegt.

F r a k t i o n E V b: ergibt einen sehr dünnen kaum sichtbaren Streifen der bei MG 14200 beginnt und sein Ende bei ca. 58000 findet. Er beinhaltet zwei Ovale mit dem MG von 17000 und 26800.

F r a k t i o n E V c: besteht aus einem ovalen Flecken vom MG 17500.

F r a k t i o n E V/VI: zeigt einen Schweiß mit zwei Kreisen am Anfang und Ende von einem MG von 16800 und 58000.

F r a k t i o n E VI + (V): zeigt ein Oval mit dem MG von 17200 von dem ein kleiner Schweiß weiterführt bis zu einem MG von ca. 60 000.

F r a k t i o n E VI₁: besteht aus einem dominierenden Oval mit dem MG von 13000 von dem ein Streifen weiterführt zu einem Oval mit dem MG von 18000 + 64000. Der Streifen endet bei einigen Abläufen bei einem MG von ca. 140 000.

F r a k t i o n E VII: ergibt ein Oval mit dem MG von 62000. Ferner ist ein dünner Nebel bei einem MG von ca. 16000 zu sehen.

F r a k t i o n E VIII: ist schwach zu erkennen bei einem MG von ca. 23500, ferner ein Oval beim MG von 53000.

F r a k t i o n E IX: liegt bei einem MG von 13400 und zeigt hier das erste Oval. Ein Schweiß führt fort zu dem dominierenden Oval mit dem MG von 60000, das dann bei ca.

63000 ausläuft.

F r a k t i o n E X: ergibt beim Ablauf keinen Hinweis darauf, daß auch nur eine Komponente vorhanden sein könnte.

Ablauf des Gesamtextraktes: Es ist sehr schwierig hier genauere Angaben zu machen. Zwei Ovale fallen gleich auf, das erste bei einem MG von 17000, das zweite bei 36000, dem ein dicker Schweif folgt bis zu einem MG von ca. 65000, dieser wird dann dünner und endet beim MG von 770000 (Ausschlußgrenze MG 800000). Im dünneren Schweif ist noch eine Komponente bei ca. 140000 MG zu erkennen.

Tabelle II

Fraktion	Beginn des Schweifes	Komponenten				Ende des Schweifes	Ausschluß- grenze
E I					64000	68000	
E II	13500				62000		800000
E III	14000	(18000?)				113000	800000
E IV		17500	47500 =	$\begin{cases} 37000? \\ 67000? \end{cases}$		ca 160000	
E V		17000	(26000 gering)	60000		ca 140000	
E V a				86000 gering			
E V b	14200	17000	26800			ca 58000	
E V / VI		16800		58000			
E VI + (V)		17200				ca 60000	
E VI ₁		13000		64000		ca 140000	
E VII		(16000?)		62000			
E VIII			ca 23500	53000			
E IX		13400		60000		ca 63000	
E X	Ohne Befund						

Gesamtextrakt: 17000 36000 65000 140000 Ende des Schweifes: ca 770000

unterstrichene Zahlen bedeuten eine ausgeprägte Komponente

DISKUSSION

I Diskussion der Methodik

Die Arbeit zeigt eine grobe Orientierung über das Verteilungsmuster der spezifischen Myocardproteine des Kalbsherzens hinsichtlich ihres dünn-schicht-gel-chromatographischen Verhaltens. Eine bessere Einteilung und Bestimmung wäre möglich, durch eine Isolierung und Reindarstellung der Einzelkomponenten. Nowy (52) erreicht durch kontinuierliche trägerfreie Elektrophorese größere Mengen von uneinheitlichen Fraktionen, die er dann durch präparative Papierelektrophorese reinigt und so zu einer weitgehenden Reindarstellung von 11 elektrophoretischen Fraktionen gelangt. Diese wurden anschließend von uns durch die Dünnschicht-Gel-Chromatographie weiter aufgeschlüsselt. Wir gelangten zu einer verhältnismäßig guten Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen von Nowy erzielten Ergebnissen.

Die Dünnschicht-Gel-Chromatographie ist eine gangbare Methode zur Bestimmung von globulären Proteinen. Untersuchungen von Radola (57) zeigen, daß diese Methode von prinzipiellen Fehlern behaftet sein kann. Ein Grund ist darin zu suchen, daß die Linearität für Sephadex G 200 superfine in einem Bereich vom Molekulargewicht 10 000 bis 240 000 zu finden ist. Er weist nach, daß bei dem von uns gebrauchten Gel in seinem Molekulargewichtsbereich eine Unsicherheit von $\pm 10\%$ einzubeziehen ist.

Gute Ergebnisse bei der Bestimmung von globulären und kohlenhydratfreien Proteinen fanden Andrews (5,6), Determann (19,22) und Whitaker (67).

Zu sehr vielen Ergebnissen bei der Molekulargewichtsbestimmung ist man bisher durch die Säulengelfiltration gelangt.

Die Autoren Andrews (5), Determann und Michel (21-23), Morris (48), Bergström (11) und Roberts (58) stellten eine gute Übereinstimmung der Gelfiltration mit der Dünnschicht-Gel-Chromatographie fest. Globuläre Proteine, die durch die Säulengelfiltration und andere Methoden bestimmt wurden, gaben übereinstimmende Werte mit der Dünnschicht-Gel-Chromatographie, während kohlehydratreiche Proteine sowohl bei der Säulengelfiltration als auch bei der Dünnschicht-Gel-Chromatographie herausfielen (Andrews 5, 6, Whitaker 67, Ward und Arnott 65).

Die unbekannten Grenzen bei der Bestimmung der Molekulargewichte mit unserer Methode führen Andrews (6, 7) und Radola (57) an. Sie zeigen, daß Fibrinogen und Apoferritin nicht auf der Geraden liegen, daß γ -Globulin mit einem Molekulargewicht von 160 000 ein Molekulargewicht von 200 000 vortäuscht und Ovalbumin aus nicht bekannten Gründen sich manchmal unterschiedlich verhält. So zeigt Haemoglobin sowohl bei der Säulengelfiltration (Andrews 5, Whitaker 67), als auch bei der Dünnschicht-Gel-Chromatographie (Morris 48, Radola 57) ein Molekulargewicht von nur 35600, also etwa der Hälfte gegenüber anderen Bestimmungsmethoden. Leach und O'Shea (44) stellen fest, daß Cytochrom C ein wesentlich höheres Molekulargewicht vortäuscht als in der Literatur angegeben.

Siegel und Monty (59) und Radola (57) sehen Diskrepanzen bei der Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex letztlich darin, daß der R_M Wert nicht vom Molekulargewicht sondern vom Stoke'schen Radius abhängt. So findet auch Radola heraus, daß Ferritin, Urease und Fibrinogen nicht in die Gerade der R_M Werte der Molekulargewichte paßt, sondern in die Gerade der R_M Werte des Stoke'schen Radius. Anscheinend ist zum Herausfinden der Größe des Proteins beides notwendig (Ackers 1, Andrews 5, 6, Determann 19, Whitaker 67).

Whitaker (67), Leach und O'Shea (44) kamen ferner zu dem

Ergebnis, daß sich geringfügige Fehler durch unterschiedliche Außentemperatur einschleichen können.

Radola (57) stellt Versuche über das Auftragen der Proteine auf einer 0,5 mm dicken Sephadex Gelschicht an. Dabei zeigt er, daß der R_M Wert sich bei Walsperma, Myoglobin, Rinder-serum Albumin, Haemoglobin und Plactoglobin je nach Konzentration der Proteinlösung gering ändert, ebenso auch bei Änderung des Auftragsvolumens.

Die Dünnschicht-Gel-Chromatographie hat sich für unsere Zwecke als einfache, schnelle und schonende Methode erwiesen, um im Vergleich mit anderen Methoden die Molekulargewichte zu schätzen. Für eine exakte und hinreichend genaue Molekulargewichtsbestimmung ist sie auf Grund der bereits diskutierten Fehlermöglichkeiten nicht optimal geeignet, zumal die zu untersuchenden Proteine unbekannt sind und wir nicht wissen, ob sie globulär und kohlehydrat reich sind, dazu kennen wir nicht die Konzentration oder ihre Stokes'schen Radii.

Weitere Fehler können sich durch die Arbeitstechnik einschleichen, worüber noch keine klärenden Versuche existieren. Johansson und Rymo (41) und Morris (48) verwenden zum Aufbereiten des Gels gerade soviel Lösung, daß eine dicke Suspension entsteht, die dann sofort aufgetragen wird, während Determann (19) und Radola (57) das Gel über längere Zeit quellen lassen und dann abdekantieren.

Radola gebraucht die fertigen Platten sofort oder bewahrt sie in einer feuchten Kammer bis zum weiteren Gebrauch auf. Determann und Mattner (20) lassen die beschichteten Platten immer für 12 Stunden bis 8 Tage in einer feuchten Kammer liegen, die inwendig mit nassem Filterpapier ausgekleidet ist. Radola (57) geht noch weiter und äquilibriert sie während einer Nacht unter Versuchsbedingungen vor.

Uneinigkeit herrscht auch über die Zeit und den Winkel des

Ablaufs. Radola (57) arbeitet mit einem Winkel von 10° - 15° und fordert, daß das Myoglobin nur 1 cm pro Stunde wandert, und daß die Höhe des Elutionsmittelspiegels für diese Geschwindigkeit eingestellt werden muß. Seine Versuche dauern 4-7 Stunden. Determann und Mattner (20) lassen ihr Cytochrom C 2 cm pro Stunde laufen und arbeiten mit einem Winkel von 15° - 30° . Ihr Versuchsablauf dauert 5-8 Stunden.

Das Problem des Auftragens und Wiederfindens der Auftragsstellen der Proteine wurde von uns mit Hilfe der Führungsrinnen in einer Brücke über der Gelplatte gelöst (s. S. 12). Die bisherige Arbeitsweise bestand allgemein im freihändigen Auftragen und Wiedersuchen der Stellen.

Beim Abklatsch wird bei allen Autoren das Papier nicht auf der Platte getrocknet, sondern entweder nach Abnahme im Heißluftschrank bei 110° , bei feuchter Hitze um 110° oder unter einem Fön. Bei der Trocknung auf der Platte treten Verschiebungen auf, die sich speziell am Rand auswirken. (Morris 48)

Beim Anfärben werden verschiedene Methoden beschrieben, Amido Schwarz oder Comassie Brilliant Blau, ferner ein Sichtbarmachen unter UV Licht nach vorherigem Besprühen mit Pauly'schem Reagens (Determann 19).

Eine andere Methode ist das vorsichtige Trocknen der Platten im Trockenschrank bei 50°C und anschließendes Entwickeln. Ferner besteht die Möglichkeit Proteine durch die Umsetzung mit Fluorescein-isothiocyanat vor dem Auftragen zu färben wobei sie sich im UV Licht während ihrer Wanderung gut erkennen lassen (Johansson und Rymo 4). Dieses führt aber zu einer Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit.

Das Auswerten des Ablaufes ist nach unserer Ansicht eines der zentralen Probleme. Bis auf Radola (57) kreisten alle anderen Autoren die Abläufe mit einem Bleistift ein und

maßen dann die Entfernung zum Startfleck. Radola arbeitet mit Hilfe eines Integral Dichtemessers und findet so das Molekulargewicht und die Volumenzusammensetzung der ablaufenden Proteine. Er trägt dabei die Proben nicht als runde Flecken sondern mit Hilfe eines Mikroskopierdeckglases als Rechteck auf. Ähnliche Versuche von unserer Seite schlugen fehl, da der Fehler durch das Abklatschpapier und dem darauf haftenden Gel zu groß war.

Im Laufe der Aufbereitung des Untersuchungsmaterials ist der Muskel unphysiologischen physikalischen Einflüssen ausgesetzt. Poel (56) fordert eine möglichst kurze Homogenisierungszeit des Muskelgewebes, da es sonst zu Proteindenaturierung durch Oxidation von SH-Gruppen und zur Inaktivierung von Dehydrogenasen kommen kann. Nach Stern und Bird (60) ist eine Arbeitsspanne von 2 Minuten, an die wir uns hielten, möglich. Bei langsamer Erwärmung gefrieretrockneten Gewebes auf Zimmertemperatur tritt nach Mac Kenzie und Luyet (43) kein Verlust der Löslichkeit der Proteine ein. Weder durch zweimonatige Lagerdauer bei -20°C , noch durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen beobachten Bauer und Mit. (10) eine Änderung der Pherogramme von Muskelextrakten. Auch wir können durch längere Lagerung bei Tiefkühltemperaturen und durch häufigeres Auftauen nicht mit Sicherheit eine qualitative Änderung der Proteinzusammensetzung des Kalbsmyokardextraktes feststellen.

II Diskussion der Ergebnisse

In der Literatur findet sich beachtliche Unterschiede der Ergebnisse, die die Eiweißfraktionen aus Muskelgewebe betreffen. Eine Ursache ist sicher die große Anzahl der Trennverfahren, eine weitere die verschiedenen Bedingungen während der Extraktionen. Entscheidend für die Extraktions-

bedingungen ist die Ionenstärke der verwendeten Lösung. Die Eiweißzusammensetzung der Extrakte ändert sich unter verschiedenen Ionenstärken nicht langsam sondern plötzlich (Bosch 13). Proteine, die mit Lösungen schwacher Ionenstärke extrahiert wurden bilden eine Gruppe, die man mit Einschränkung als Proteine des Sarkoplasmas bezeichnen kann. Nowy (51) fordert zur Gewinnung von kontraktile Fraktionen eine Ionenstärke von mindestens 0,35. Unsere Proteine wurden mit destilliertem Wasser extrahiert, so daß man mit Sicherheit behaupten kann, daß sie frei von kontraktilem Eiweiß sind. Unser Untersuchungsmaterial besteht zum größten Teil aus Sarkoplasmaeiweiß.

Hülsmans (37) fordert zur Trennung der Sarkosomen und Zellstrukturen eine Beschleunigung von 33000 g, zur Abtrennung der Mikrosomenfraktionen werden 105000 g benötigt. Die Bindung glykolytischer Enzyme an die Ultrastruktur der Zelle erforschten Amberson und Mit. (4), sie zeigen dabei, daß Muskelhomogenate gegenüber Muskelpreßsäften doppelte Enzymaktivitäten enthalten. Borst und Peeters (12) homogenisieren den Herzmuskel und erkennen, daß sowohl die cytoplasmatische als auch die strukturgebundene GOT freigesetzt wird.

Unser Herzmuskelextrakt enthält auf Grund seiner Aufbereitung keine oder nur sehr geringe Beimengungen aus dem Blut. Es wird aber ein Vorhandensein von Serumeiweiß im Interzellularraum und Bindegewebe diskutiert. Gitlin und Mit. (29) weisen durch Immunfluoreszenz Serumproteine im Endothel und Bindegewebe des Perikards, Endokards und Myokards nach, nicht aber im Intrazellulärraum.

Bauer (10) stellt fest, daß sich keines der Skelettmuskelpherogramme von 6 verschiedenen Spezies gleicht hinsichtlich ihrer Mobilität als auch ihrer Anordnung der Komponenten. Nowy und Mit. (53) finden variierende Pherogramme je nach Tierart beim Herzmuskel durch vergleichende elektro-

phoretische Untersuchungen. Grouchy und Roubin (31) beobachten keine nennenswerten Differenzen im Proteinstmuster gleicher Organe bei 7 Individuen. Quantitative Unterschiede findet Nowy (51) sogar im linken und rechten Ventrikel und Vorhof bei einer Spezies. Cruck (17) findet bei ähnlichen Untersuchungen übereinstimmende Ergebnisse. Den Unterschieden in der Proteinzusammensetzung verschiedener Muskelarten und Teilen des Herzens kommt wohl funktionelle Bedeutungen zu. Daher muß die Ausstattung der Organe mit Enzymen, Transport und Reserveproteinen derart vielgestaltig sein. Crepax (15) findet bei Muskeln mit rascher Kontraktion und solchen mit langsamer Kontraktion eine allmähliche Abnahme der Bestandteile der Myogengruppen und Zunahme des Myoalbumins, das sich ebenfalls vermehrt im embryonalen als auch atrophischen Muskeln findet. Durch Elektrophorese findet Helander (35) aus Extrakten des Reizleitungssystems des Herzens noch zusätzliche Komponenten, die eine Ähnlichkeit mit Proteinen des Nervengewebes zeigen. Dubuisson (25) beobachtet eine unterschiedliche Extrahierbarkeit von Eiweißkörpern bei Skelettmuskulatur in Abhängigkeit von der Phase des Kontraktionszykluses, was Nowy und Seitz (55) am Herzen nicht nachweisen konnten. Es ergaben sich aber Unterschiede bei Herzen die in Starre bzw. bei Kontraktur fixiert wurden.

Die Dünnschicht-Gel-Chromatographie von Myokardextrakten ergibt bei gleicher Verarbeitungsweise des Gewebes und sorgfältiger Behandlung des Herzens gut reproduzierbare Bilder. Es kann daher versucht werden einzelne Ablaufskomponenten mit bekannten Eiweißbausteinen des Herzmuskels in Beziehung zu bringen und zu bezeichnen.

Die Fraktion E I ist fast einheitlich und scheint dem Myoalbumin zu entsprechen. Es wurde schon 1937 von Bate-Smith (9) beschrieben und seine Ähnlichkeit mit Serumalbumin er-

kannt. Formanek (27) weist sogar 3 Myoalbuminkomponenten in der Rattenmuskulatur nach. Nowy (51) und Bauer (10) bestätigen durch ihre Versuche eine Identität zwischen Myoalbumin und Serumalbumin. Ein Prämyoalbumin konnte als einzelne Komponente nicht nachgewiesen werden. Die Fraktion E II wurde von Nowy (52) säulenchromatographisch mit einem MG von 81 000 und einem MG über 600 000 angegeben. Wir fanden einen Schweif, der etwa beim MG 13 500 beginnt, eine schwache Komponente beim MG 62 000 - also auf der Höhe des Myoalbumins - hat und eine sehr starke Komponente über der Ausschlußgrenze vom MG 800 000 aufweist. Bei den Fraktionen E III bis E VII findet sich regelmäßig bis auf E Va eine Komponente, die mit dem Myoglobinkomponente zu vergleichen ist. Die stärkste Myoglobinkomponente scheinen die Fraktionen VI zu enthalten, was schon makroskopisch vor dem Parben anhand des roten Punktes auf dem Abklatsch zu erkennen ist. Ferner zeigt E VI₁ eine zusätzliche starke Komponente mit dem MG von 13 500, die bei E IX in geringer Menge wieder erscheint. Häufiger kommen in dieser Gruppe Proteine mit dem MG von 58 000 bis 64 000 vor. Lediglich E Va zeigt nur ein MG von 36 000 und E Vb ein zusätzliches MG von 26 800, was auch bei E VIII in geringen Mengen erscheint. Aus dem Ablauf des Gesamtextraktes ist nur sehr grob eine Verteilung der Molekulargewichte zu erkennen.

Untersuchungen am pathologisch veränderten Muskelgewebe mit Hilfe der Elektrophorese von Organextrakten führte Nowy (54) durch. Er fand im experimentell hypertrophischen Myocard eine Zunahme der Actomyosinkonzentration um etwa 30% und eine Abnahme des nicht kontraktile Eiweißes um etwa 25%. Hughes (36) stellt bei Skelettmuskeltrophie einen erheblichen Verlust an Myoglobin und anderen Komponenten und Zunahme

me des Myoalbumins fest.

Ähnliche Ergebnisse fanden Mittelbach und Hamburger (47) bei Muskeln mit neurogener Atrophie, Myopathie und Myositis.

Pathologische Vorgänge können durch Gewebsläsionen zur Freisetzung von Fermenten führen, aus denen die Proteine des Sarkoplasmas zu einem wesentlichen Prozentsatz bestehen, und die dann im Serum nachgewiesen werden können. Bei Patienten mit Myocardinfarkten findet Wieme (68) die LDH Fraktionen I und II im Serum vermehrt. Bei Karzinosen und Leukämien sind alle LDH Isoenzyme vermehrt. Genauere Messungen aller LDH Isoenzyme bei verschiedenen Erkrankungen führt Wroblewsky (69) durch. Erdely (26) berichtet über die Zuordnung von GOT- und CPK Isoenzymen zu den elektrophoretischen Komponenten von Kalbsherzproteinen. Kamaryt und Szavorka (42) stellen bei Herzinfarkten gleichzeitig LDH-, GOT- und IDH Isoenzyme dar und kommen so zu exakteren Aussagen. Dikow und Tschakyrow (24) finden bei Herzinfarkten eine Erhöhung einiger Aldolase Isoenzyme. Ein spezifischer Herzfermentnachweis ist bisher aber noch nicht entdeckt worden.

Verfeinerte Untersuchungsmethoden über die Proteinzusammensetzung des Myocards sei es mit Hilfe der Dünnschicht-Gel-Chromatographie, Säulenchromatographie in Verbindung mit Elektrophorese könnten zur Isolierung spezifischer Herzmuskelproteine beitragen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden durch Homogenisieren und Zentrifugieren die löslichen, nicht kontraktilen Proteine des Kalbsmyokards extrahiert. Anschließend fand eine Fraktionierung des Extraktes mit Hilfe der kontinuierlichen Elektrophorese statt. Die gewonnenen 9 Fraktionen wurden durch die Dünnschicht-Gel-Chromatographie in Komponenten aufgeschlüsselt und ihr Molekulargewicht mit Hilfe bekannter Bezugsproteine anhand der R_M Werte geschätzt. Diese Auftrennung der Myokardproteine in zwei Dimensionen durch die Elektrophorese und Dünnschicht-Gel-Chromatographie ergab 24 Eiweißkomponenten.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ACKERS, G.K.:
Molekular Exclusion and Restricted Diffusion Processes
in Molekular-Sieve-Chromatography.
Biochemistry, 3 (1964) 723
- 2) AGOSTONI, A., VERGANI, C., CIRIA, E.:
Protides of the Biological Fluids.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam Vol. 14 (1966)
625
- 3) AGOSTONI, A., VERGANI, C., LOMANTO, B.:
Charakterization of serum proteins by thin-layer gel
filtration combined with immunodiffusion.
J. Lab. Clin. Med., 69 (1967) 522
- 4) AMBERSON, W.R., ROISEN, F.J., BAUER, A.C.:
The Attachment of Glycolytic Enzymes to Muscle Ultra-
structure.
J. Cell. and Comp. Physiol., 66 (1965) 71
- 5) ANDREWS, P.:
Estimation of the molecular weights of proteins by
Sephadex gel filtration.
Biochem. J., 91 (1964) 222
- 6) ANDREWS, P.:
The Gel Filtration Behaviour of Proteins related to
their Molecular Weights over a Wide Range.
Biochem. J., 96 (1965) 595

- 7) ANDREWS, P., in PEETERS, H.:
(editor), *Protides of the Biological Fluids*.
Vol. 14, *Proceedings of the Fourteenth Colloquium*,
Bruges, 1966, Elsevier, Amsterdam, 1967, p. 573
- 8) BARANOWSKY, T.:
Die Isolierung von krystallisierten Proteinen aus Kaninchenmuskel.
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem., 260 (1939) 43
- 9) BATE-SMITH, E.C.:
Proc. roy. Soc. Med., 124 (1937) 136
- 10) BAUER, H., GLOTZNER, F., SCHWARZE, I., SCHMALBACH, K.:
Elektrophoretische und immuno-elektrophoretische Studien über Muskelproteine.
Klin. Wschr., 42 (1964) 1198
- 11) BERGSTRÖM, K.:
A Thin-Layer Gel-Filtration Technique for Proteins.
A simple Clinical Method for Measuring Serum Macroglobulins.
Acta Med. Scand., Suppl., 445 (1966) 127
- 12) BORST, P., PEETERS, E.M.:
The Intracellular Localisation of Glutamate-Oxalacetate Transaminase in Heart.
Biochim. Biophys. Acta, 54 (1961) 188
- 13) BOSCH, M.W.:
Quantitative Electrophoretic Study of Rabbit Muscle Proteins Soluble in Dilute Salt Solutions.
Biochim. Biophys. Acta, 7 (New York 1951) 61

- 14) CARNEGIE, P.R., PACHECO, G.:
A combination of chromatography and immuno-diffusion
on a micro-scale.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 117 (1964) 137

- 15) CREPAX, P.:
Etude Electrophoretique d'Extraits de Muscles de
Différentes Propriétés Morphologiques et Fonctionnelles.
Biochim. Biophys. Acta, 9 (1952) 385

- 16) CROMMELYNCK, F., BRISBOIS, J., PEETERS, J., GILLIO, L.:
Filtration sur gel moléculaire en couche mince des
venins de Colubridés.
J. Chromatog., 32 (1968) 598

- 17) CRUCK, S.:
Contribution à la Biochimie Comparée des Protéines
Musculaires dans les Différents Compartiments du
Cœur.
Biochim. Biophys. Acta, 10 (1953) 630

- 18) DETERMANN, H.:
Neue Anwendung der Dünnschichtchromatographie
Experientia, 18 (1962) 430

- 19) DETERMANN, H.:
Gelchromatographie - Ein Laboratoriumsbuch
(Springer 1967)

- 20) DETERMANN, H., MATTNER, U.:
Gel Chromatography as a Means for Differentiation
between Dehydrogenases
FEBS Letters, 2 (1969) 163

- 21) DETERMANN, H. u. MICHEL, W.:
Neuere Entwicklung bei der dünnsschichtchromatographischen Trennung von Proteinen.
Z. Anal. Chem. (1965) 211-212
- 22) DETERMANN, H. u. MICHEL, W.:
The Correlation between Molecular Weight and Elution Behaviour in the Gel Chromatography of Proteins
J. Chromatog., 25 (1966) 303
- 23) DETERMANN, H. u. PEETERS, H.:
(Editor), Protides of the Biological Fluids, Vol. 14, Proceeding of the Fourteenth Colloquium, Bruges, 1966, Elsevier, Amsterdam, 1967, p. 563
- 24) DIKOW, A.L., S.N. TSCHAKYRON:
Untersuchungen über die Aktivität und die Isoenzymmuster der F.P. - Aldolase im Serum von Hunden mit exp. Myocardinfarkt
Z. klin. Chem. 7, (1969) 553
- 25) DUBUISSON, M.:
Modification dans la structure physicochimique de l'édifice contractile au cours du cycle de la contraction musculaire.
Biochim. Biophys. Acta 4 (1950) 25
- 26) ERDELY, T.:
Glutamat-Oxalat-Transaminase und Kreatinphospho-Kinase in präparativ elektrophoretisch aufgetrennten Herzextrakten.
Dissertation München 1968

- 27) FORMANEK, K., J. PATSCH, R. KASCHNITZ:
Über die molekulare Heterogenität von Myoalbumin aus
Rattenmuskulatur.
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 348 (1967) 1352
- 28) FÜRTH, O.V.:
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 36
(1895) 230
- 29) GITLIN, D., LANDING, B.H., WIPPLE, A.:
The Localisation of Homologous Plasma Proteins in
Tissues of Young Human Beings as Demonstrated with
Floureszent Antibodies
J. exp. Med. 97 (1953) 163
- 30) GRANT, G.H., EVERALL, J.:
Gel immunofiltration. A new technique for the qualita-
tive analysis of serum proteins.
J. of Clinical Pathology 18 (1965) 654-659
- 31) GROUCHY, J. de, ROUBIN, M.:
Proteines et Enzymes Tissulaires - Une Etude par
Elektrophorese en Gel D'Amidon
Rev. franc. Et. clin. biol. 5 (1960) 286
- 32) HANSON, L.A., JOHANSON, B.G., RYMO, L.:
Further Applications of thin-layer gel filtration
Two dimensional gel filtration-electrophoresis and
immuno-gel filtration
Clinica chimica Acta 14 (1966) 391-398
- 33) HANSON, L.A., JOHANSON, B.G., RYMO, L.:
Protides of the Biological Fluids.
Elsevier Publishing Company, Amsterdam Vol. 14 (1966)
579-582

- 34) HANSON, L.A., ROOS, P., RYMO, L.:
Heterogeneity of Human Growth Hormone.
Preparation by Immuno-gel Filtration and Gel Filtra-
tion Elektrophoresis
Nature 212 (1966) 948
- 35) HELANDER, E.:
Studies of Chemical Components of the Conduction
System of the Heart.
Cardiologia 47 (1965) 146
- 36) HUGHES, B.P.:
The Elektrophoresis of some Human Muscle Proteins on
Starch Gels
Biochem. biophys. Res. Commun. 1 (1959) 194
- 37) HULSMANS, H.A.M.:
Microsomes in Heart Muscle Homogenates
Biochim. biophys. Acta 54 (1961) 1
- 38) JACOB, J.J.C.:
Elektrophoresis of Muscle Extracts
Biochem. J. 41 (1947) 83
- 39) JAWOREK, D.:
Dünnschichtgelchromatographie Teil 1:
Ein neues Gerät zur Dünnschicht-Gelchromatographie
Boehringer Mannheim GmbH Tutzing 292 (1969)
- 40) JOHANSON, B.G., RYMO, L.:
Thin-layer Gel Filtration
Acta chemica Scandinavica 16 (1962) 2067-2068

- 41) JOHANSON, B.G., BENGT, G., RYMO, L.:
Separation of Proteins by Thin-layer Gel Filtration
Acta chemica Scandinavica 18 (1964) 217-223
- 42) KAMARYT, J., Z. ZAZVORKA:
Die Enzymelektrophorese der Malatdehydrogenase.
Clin. Chim. Acta 9 (1964) 559
- 43) LEACH, A.A., O'SHEA, P.C.:
The Determination of Protein Molecular Weights of up
to 225000 by Gel-Filtration on a single Column of
Sephadex G-200 at 25° and 40°
J. Chromatog. 17 (1965) 245-251
- 44) MACKENZIE, A.P., LUYET, B.J.:
Freeze-Drying and Protein Denaturation in Muscle
Tissues; Losses in Protein Solubility.
Nature 215 (1967) 83
- 45) MAIER, C.L. jr.:
Preparative thin layer gel filtration
J. Chromatog. 32 (1968) 577
- 46) MAYER, A.M.:
Phytochemistry 5 (1966) 1297
- 47) MITTELBACH, F., K. HAMBURGER:
Die Proteinfractionen des menschlichen Skelettmuskels
in der direkten Gewebs-Disc-Elektrophorese und ihre
Zuordnung zu verschiedenen Enzymaktivitäten
Klin. Wschr. 47 (1969) 811
- 48) MORRIS, C.I.O.R.:
Thin-Layer Chromatography of Proteins on Sephadex
G-100 and G-200
J. Chromatog. 16 (1964) 167

- 49) NASSI, P., TREVERS, C., RAMPONI, G.:
Visualisation of acyl phosphatase after zone elektro-
phoresis and thin-layer gel filtration.
J. Chromatog. 38 (1968) 61
- 50) NAYER, P. de, WEATHERS, B., ROBBINS, J.:
Thin-Layer Gel-Filtration of Thyroid Iodoproteins.
Studies on Rat Transplantable Thyroid Tumors.
Endocrinology 81 (1967) 1118
- 51) NOWY, H.:
Elektrophoretische Analysen von Herzmuskelproteinen.
Mat. Med. Nordmark 17 (1965) 509
- 52) NOWY, H.:
Molekulargewichtsschätzungen elektrophoretischer Kom-
ponenten von Herzmuskelproteinen
(Nicht veröffentlicht)
- 53) NOWY, H., BLASIUS, R., KARL, O.:
Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen von
Herz- und Skelettmuskelproteinen verschiedener Tier-
arten.
Z. ges. exp. Med. 126 (1955) 12
- 54) NOWY, H., FRINGS, H.D., WALCHER, A., TENDERICH, L.:
Proteinzusammensetzung des Myocards bei experimentel-
ler Herzhypertrophie
Z. ges. exp. Med. 131 (1959) 478
- 55) NOWY, H., SEITZ, W.:
Elektrophoretische Untersuchungen des fixierten Kanin-
chenherzens.
Z. ges. exp. Med. 126 (1955) 1

- 56) POEL, W.F.:
Preparation of Acellular Homogenates from Muscle
samples
Science 108 (1948) 390
- 57) RADOLA, P.J.:
Thin-Layer-Gel Filtration of Proteins
J. Chromatog. 38 (1968) 61
- 58) ROBERTS, G.P.:
Thin-Layer Gel filtration of Proteins and Mucopoly-
saccharides
J. Chromatog. 22 (1966) 90
- 59) STEFEL, L.V., MONTY, K.J.:
Determination of Molecular weights and Frictional
Ratios of Proteins in Impure System by use of Gel
Filtration and Density Gradient Centrifugation.
Application to crude Preparations of Sulfite and Hydro-
xylamine Reductases.
Biochim. Biophys. Acta 112 (1966) 346
- 60) STERN, R., BIRD, L.F.:
The use of Waring Blender in Biochemical Work
Biochem. J. 44 (1949) 635
- 61) STRAUSKY, Z., SROCH, M.:
Separation of Myoglobin and Hemoglobin on Sephadex
thin-layers
J. Chromatog. 28 (1967) 135

- 62) TISELIUS, A.:
The moving boundary Method of Studying the Electro-
phoresis of Proteins
Nova Acta Reg. Soc. Scie. Upps. Ser IV Vol. 7 No 4
(1930)
- 63) VERGANI, C., STABILINI, R., AGOSTONI, A.:
Identification by immuno-gel filtration of Serum
Bence-Jones protein in cases of micro-molecular
paraproteinemia
Clin. Chim. Acta 16 (1967) 326
- 64) VERGANI, C., STABILINI, R., AGOSTONI, A.:
Electro-gel filtration: A combination of thin-layer gel
filtration on Sephadex G 200 superfine and electro-
phoresis on cellulose acetate
J. Chromatogr. 28 (1967) 135
- 65) WARREN, D. G., ARNOTT, T. S.:
Gel Filtration of Proteins with Particular Reference
to the Glycoprotein, luteinizing Hormone
Anal. Biochem. 12 (1965) 296
- 66) WEBER, H. H., MEYER, K.:
Weber: Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweiß-
körper
Meyer: Das Mengenverhältnis der Muskeleiweißkörper
in seiner Bedeutung für die Struktur des querverstreif-
ten Kaninchenmuskels
Biochem. Z. 266 (1933) 137

- 67) WHITAKER, J.R.:
Determination of molecular weights of proteins by
gel filtration on Sephadex
Anal. Chem. 35 (1963) 1950
- 68) WIEME, R.J.:
Application Diagnostique de l'Enzyme-Electrophorese
des Dehydrogenase de l'Acide Lactique.
Clin. Chim. Acta 4 (1959) 46
- 69) WROBLEWSKY, F.:
Diagnostic Dissection by Isoenzymes Pure appl.
Chem. 3 (1961) 385

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Nowy für die freundliche Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ferner gilt auch mein Dank Frau Krülle, die mich bei verschiedenen technischen Arbeiten unterstützte.

Ebenso danke ich meiner Frau für ihre Hilfe bei der Versuchsdurchführung.

LEBENS LAUF

30.6.1946	in Dinklage geboren
Eltern	Dr. Josef Nobis und Ehefrau Annemaria geb. Maibaum
April 1952	Einschulung in die Volksschule in Dinklage
April 1956	Wechsel zur Mittelschule in Dinklage
April 1959	Umschulung auf das Artland-Gymnasium in Quakenbrück
Sept. 1966	Abitur am Artland-Gymnasium
WS 1966/67	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians- Universität München, Tierärztliche Fakultät
SS 1968	Wechsel zum Studium der Zahnmedizin unter Anerkennung des Tierärztlichen Vorphysikums
SS 1969	Physikum in der Zahnmedizin
20. 6. 1972	Bestallung als Zahnarzt
1. 9. 1972	Antritt einer Assistentenstelle an der Ab- teilung für Zahnerhaltung und Parodontolo- gie der Zahnklinik der Universität München, Vorstand: Prof. Dr. E. Sonnabend
24. 4. 1973	Vermählung mit meiner Kollegin Christel Dähnke in Quakenbrück

